

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011039

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/20//C12Q1/68, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/20//C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU, X. et al., Synthesis and biological activity of a bivalent nucleotide inhibitor of ribonucleotide reductase, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, No.20, pages 2387 to 2389	1-5
A	OKAMOTO, A. et al., Phototriggered Drug Release from Functionalized Oligonucleotides by a Molecular Beacon Strategy, Angewandte Chemie International Edition, 2003, Vol.42, No.22, pages 2502 to 2504	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August, 2004 (27.08.04)

Date of mailing of the international search report

14 September, 2004 (14.09.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011039

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MA, Z. et al., Nucleic acid-triggered catalytic drug release, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, Vol.97, No.21, pages 11159 to 11163	1-5
A	JP 61-112077 A (Pierrel Spä.), 30 May, 1986 (30.05.86), Full text & EP 175325 A2 & US 4774325 A	1-5
A	JP 1-500353 A (Institut Pastool), 09 February, 1989 (09.02.89), Full text & WO 88/00593 A1 & EP 254646 A1 & FR 2601956 A1	1-5
A	JP 2001-270896 A (Pro-neuron, Inc.), 02 October, 2001 (02.10.01), Full text & WO 92/13561 A1 & EP 570519 A1	1-5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011039

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011039

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention of claims 6-8 involves selective release of a medical drug through release of the R group moiety. In this case, the invention pertains to methods for treatment of a human body by therapy and thus relates to a subject matter (Continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/011039

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

which this International Searching Authority is not required to conduct international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/20//C12Q1/68, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07H19/173, 19/20//C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WU, X. et al., Synthesis and biological activity of a bivalent nucleotide inhibitor of ribonucleotide reductase, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, Vol.10, No.20, pages 2387-2389	1-5
A	OKAMOTO, A. et al., Phototriggered Drug Release from Functionalized Oligonucleotides by a Molecular Beacon Strategy, Angewandte Chemie International Edition, 2003, Vol.42, No.22, pages 2502-2504	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.08.2004

国際調査報告の発送日

14.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4C 9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MA, Z. et al., Nucleic acid-triggered catalytic drug release, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, Vol.97, No.21, pages 11159-11163	1-5
A	J P 61-112077 A (ピエレル・ソチエタ・ペル・アチオニ) 1986.05.30、全文 & EP 175325 A2 & US 4774325 A	1-5
A	J P 1-500353 A (アンステイテユ・パストウール) 1989.02.09、全文 & WO 88/00593 A1 & EP 254646 A1 & FR 2601956 A1	1-5
A	J P 2001-270896 A (プロニューロン, インコーポレイテッド) 2001.10.02、全文 & WO 92/13561 A1 & EP 570519 A1	1-5

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☒ 書面

☐ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれる

☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6-8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 6-8に係る発明は、R基部分の放出により医薬品が選択的に放出される場合も含まれ、その場合、治療による人体の処置方法に関するものとなるところ、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 明 細 書

### 酸化により機能性ユニットを放出するヌクレオシドおよびそれを含むオリゴヌクレオチドの製造法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、酸化により塩基部分に結合している機能性ユニット、レポーターユニット、または生体機能分子を放出させる方法、及びそのためのヌクレオシド、又はヌクレオチドもしくはそれを含むオリゴヌクレオチドに関する。

#### 背景技術

- [0002] DNAバイオセンサーは、標的遺伝子から必要な情報を引き出すための便利で早い手法を提供してきた。例えば、分子ビーコンのような配列特異的なシグナルを与えるDNAプローブなどのような、いろいろなDNAプローブが、このために用いられてきた(非特許文献1〜3参照)。しかし、有用な機能性の分子を放出することができるDNAプローブはほとんどなかった(非特許文献4〜6参照)。

また、核酸からの薬剤放出手段としての従来法では、ニトロペンジル基やフェニル基の光分解が利用されてきた。しかしながら、機能性分子をポスト合成法で導入する方法を使うための分子設計が容易ではなく、また、薬剤放出時にニトロソ基などの核酸にとって有害な反応種を生じる。

また、蛍光修飾した核酸から蛍光部位を除去する手法は、これまでに報告されていない。

- [0003] 非特許文献1: Tyagi, S., et al., Nat. Biotechnol., 1996, 14, 303-308  
非特許文献2: Tyagi, S., et al., Nat. Biotechnol., 1998, 16, 49-53  
非特許文献3: Piatek, A. S., et al., Nat. Biotechnol., 1998, 16, 359-363  
非特許文献4: Ma, Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 11159-11163  
非特許文献5: Ma, Z., et al., Med. Chem., 2001, 9, 2501-2510  
非特許文献6: Okamoto, A., et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 2502-2504

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] 酸化や光の照射などの外的刺激により特定の分子を放出させることができるシステムは、遺伝子の解析や各種の疾患に治療や診断に極めて有用な手法となる。

本発明は、オリゴヌクレオチドに結合している色素や薬剤などの有用な物質を、標的の核酸を損傷させることなく、容易に放出させ、また当該放出により標的部分に当該物質を導入することができる方法、及びそのための新規な塩基を提供する。

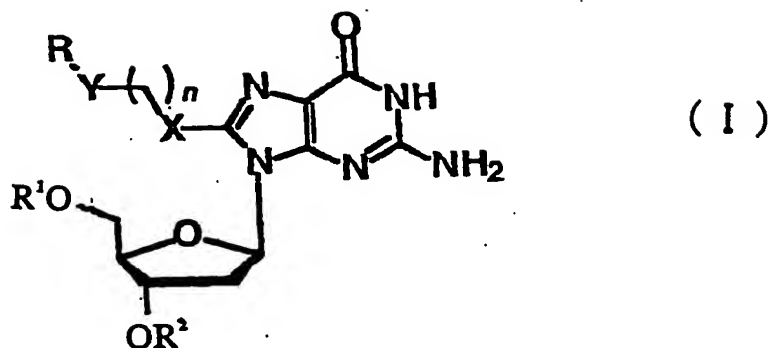
#### 課題を解決するための手段

[0005] 上記のようなヌクレオシドとそれを含むオリゴヌクレオチドを用いることにより、光照射・酸化剤処理などの外部刺激により機能性ユニットを核酸から放出できるようになる。従って、特定の核酸配列での薬剤・リポーター分子の放出や核酸上の標識の着脱が可能になり、つまり以下に示すようなことが期待できる。1) 蛍光性色素や放射性物質で標識された核酸の使用後の標識の分解と遺伝子などへの核酸の再生、2) ジーンセンサーとして目的塩基配列や一塩基多型の検出、3) DNAの複製、RNAへの転写、タンパクの認識など遺伝子発現制御のためのドラッグデリバリーDNA、4) DNAナノワイヤー(分子論理回路、バイオセンサーなど)の出力シグナルへの利用等が可能になる。

[0006] 本発明者らは、ホールの発生によってグアニンが分解していく機構に基づいて薬剤放出性のヌクレオシドを設計してきた。そして、グアニンの8位を修飾する方法を検討してきたが、放出されるべき分子とグアニンの間を、ヘテロ原子を介して連結させることにより、天然のグアニンよりもホールを生じやすい、即ち酸化されやすいヌクレオチドの塩基部分を得ることができることを見出した。

[0007] 即ち、本発明は、次式(I)

[0008] [化3]



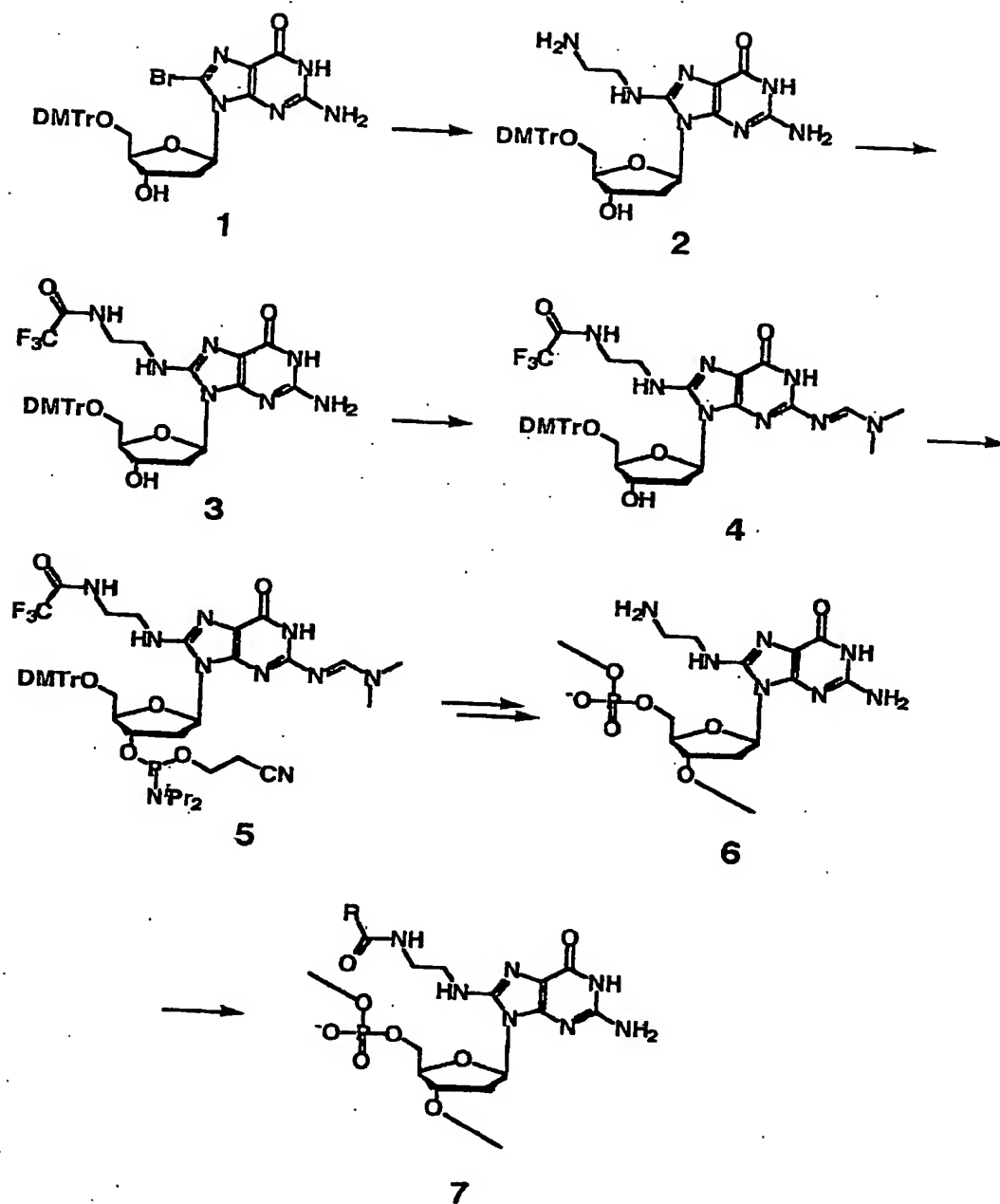
[0009] (式中、X及びYはそれぞれ独立して $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{N}(\text{アルキル})-$ 、 $-\text{S}-$ を示し、Rは機能性ユニット、レポーターユニット、または生体機能分子を示し、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ はそれぞれ独立して、水素原子、リン酸結合基、ホスホロアミダイド基、ヌクレオチドを示し、nは1から10の数字を示す。)

で表される、ヌクレオシド、又はヌクレオチドもしくはそれを含むオリゴヌクレオチドに関する。

また、本発明は、前記した本発明のヌクレオチドを含有してなるオリゴヌクレオチドを用いて、当該塩基部分におけるR基部分を放出させる方法に関する。

[0010] 本発明者らは、このためにグアニンの8位がヘテロ原子で置換されたグアニン誘導体を製造した。8位に導入すべきヘテロ原子を有する基としてエチレンジアミンを採用してみた。その製造例を次に示す。

[0011] [化4]



[0012] 8-グロモグアニンの5'位を4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護した化合物 (1) をエチレンジアミンで処理して、8位にエチレンジアミノ基が導入されたグアニン誘導体 (2) とする。これをトリフルオロ酢酸でトリフルオロアセチル化して末端のアミノ基を保護した化合物 (3) とし、次いで2位のアミノ基をジメチルアミノメチリデン基で保護した化合物 (4) とした後に、シアノホスホロアミダイド法 (例えば化合物 (5)) などに

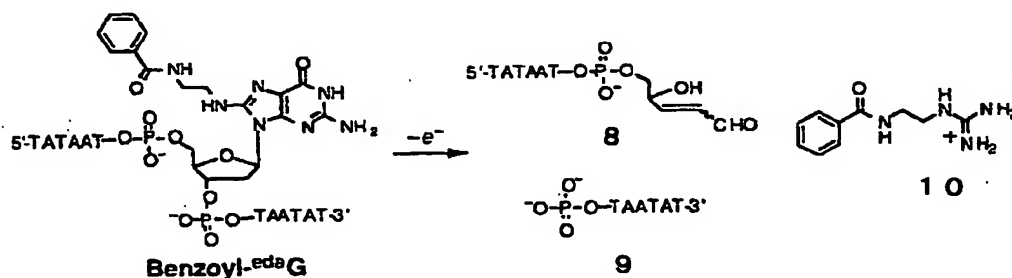
より他のヌクレオチドに結合させてオリゴヌクレオチドとして、8位の末端のアミノ基及び2位のアミノ基の保護基をはずすことにより8位にエチレンジアミノ基を有するグアニン誘導体(以下、<sup>eda</sup>Gと略す。)を含有するオリゴヌクレオチド(6)を得ることができた。

このエチレンジアミンで修飾されたグアニン誘導体の末端のアミノ基に各種の分子を導入してN-修飾-<sup>eda</sup>Gとした。前記の反応式ではR-CO-のアシル基で修飾したオリゴヌクレオチド(7)を示している。例えば、オリゴヌクレオチド(6)を安息香酸スクシンイミジルエステルでアシル化することにより、ベンゾイル-<sup>eda</sup>Gを得ることができる。

[0013] 本発明者らは、ベンゾイル-<sup>eda</sup>G (<sup>Bz-eda</sup>G) を含有するオリゴヌクレオチド(7)、例えば、5'-d(TATAAT<sup>Bz-eda</sup>GTAATAT)-3' :

を用いて光酸化反応を行った。1本鎖のこのオリゴヌクレオチド(ODN)に、リボフラビンの存在下に366nmの光を照射したところ、このオリゴヌクレオチド(ODN)は速やかに分解した( $t_{1/2}$  = 6.2分)。この反応の分解生成物を質量分析機で分析した結果、この光酸化反応は次に示す反応式、

[0014] [化5]



[0015] により進行したものであることがわかった。即ち、<sup>Bz-eda</sup>Gの箇所での光分解反応が進行し、この部分でプリン環部分及びその糖鎖が解裂したもので、その結果5'側の分解生成物(8)と、3'側の分解生成物(9)、及びベンズアミド誘導体(10)が生成した。このような分解は、既に報告されているグアニンのカチオンラジカルを経由した分解と考えられ、その結果ベンズアミド誘導体(10)が放出されたものと考えられる。

図1に酸化による1本鎖のこのオリゴヌクレオチド(ODN)にHPLCの結果を示す。図1の(a)は原料の1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)のHPLCであり、図1の(b)は

、光の照射による分解生成物のHPLCの結果を示す。図1の(c)は後述するイリジウムによる酸化の分解生成物のHPLCの結果を示すものである。

図2に光の照射による分解生成物のMALDI-TOFの結果を示す。図2中の2370 . 61のピークは、内部標準として用いた原料のオリゴヌクレオチドのピークである。19 67. 68のピークは5'側の分解生成物(8)を示し、1870. 11のピークは3'側の分解生成物(9)を示す。図3は、光を照射した1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)のLC-ESI/MS/MSによる分析結果を示すものである。図3の上段は、MS207を含むの溶出物のものであり、中段はMS207のフラグメンテーションを示したものであり、下段は、インタックC-18カラム(2. 0×50mm)を用いた液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示したものである。

この<sup>Bz-eda</sup>Gの酸化電位( $E_{1/2}$ )は、0. 59V(VS NHE)であった。この酸化電位は、8-オキソグアニンの酸化電位である0. 58-0. 75V(Hickerson, R.P., et al., J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 9423-9428)に近い値であった。

また、8-オキソグアニンや8-オキソアデニンが部位特異的にイリジウム(IV)で酸化されることが報告されている(Muller, J.G., et al., Nucleic Acids Res., 1998, 26, 2247-2249)。そこで、5'-d(TATAATXTAATAT)-3' (Xは、<sup>Bz-eda</sup>G、又はテトラメチルローダミン(TAMRA)-<sup>eda</sup>Gを示す。)を、ナトリウムヘキサクロロイリデート(IV)を用いて酸化してみた。その結果、いずれのオリゴヌクレオチドも、修飾された<sup>eda</sup>Gの部分(Xの部分)で速やかに分解されて、15分間でそれぞれ57%及び89%が分解した。

[0016] 次に本発明者らは、ロングレンジのホールの移動について検討した。そのためにテトラメチルローダミン(TAMRA)-<sup>eda</sup>Gを含有するオリゴヌクレオチド

5'-(<sup>32</sup>P)-d(ATTTATAGTGTGGGTTGTTXTTTATTAT)-3':

(Xは、テトラメチルローダミン(TAMRA)-<sup>eda</sup>Gを示す。以下、このオリゴヌクレオチドを「ODN1」という。)を用いた。この相補鎖として、

3'-d(TAAATATCACACCCAACAACAAATAATA)-5':

(以下、このオリゴヌクレオチドを「ODN2(T)」という。)、及びホールを注入するためのシアノベンゾフェノン-修飾ウリジン(U\*)を7番目のチミン(T)の代わりに導入した

オリゴヌクレオチドである、

3'-d(TAAATAU<sup>\*</sup>CACACCCAACAACAAATAATA)-5' :

(以下、このオリゴヌクレオチドを「ODN2(U<sup>\*</sup>)」という。)を製造した。これらのオリゴヌクレオチドを図4に示す。

[0017] 2本鎖のDNAである、ODN1/ODN2(T)及びODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)にそれぞれ312nmの光を照射した。オリゴヌクレオチドからの光分解物を遠心分離フィルター(ミクロンYM-3)で分離し、576nmの蛍光を測定した。ODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)のろ液から、強い蛍光を測定することができた。光照射から60分後には、ODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)のろ液からは、対照のODN1/ODN2(T)のろ液の約7倍の蛍光が観測された。結果を図5の(A)に示す。図5の(A)は黒丸印(●)はODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)の場合を示し、黒四角印(■)はODN1/ODN2(T)の場合を示す。図5の(A)の縦軸は蛍光強度(a. u.)を示し、横軸は光照射からの時間(分)を示す。

また、ODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)の<sup>eda</sup>Gサイトでの分解率をPAGEでの分析により調べた。結果を図5の(B)に示す。図5の(B)の縦軸は分解率(%)を示し、横軸は光照射からの時間(分)を示す。また、図6に2本鎖のDNAであるODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)に312nmの光を照射した結果の蛍光強度の変化を示す。図6の縦軸は蛍光強度(a. u.)を示し、横軸は波長(nm)を示す。

このことから、蛍光強度の変化は、オリゴヌクレオチドの<sup>eda</sup>Gサイトでの分解率と非常によい相関があることがわかった。加えて、5'側のGGGの部分が光の照射により障害を受けていることがPAGE分析により判明した。

図7は、2本鎖のDNAであるODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)に312nmの光を照射したときの分解生成物のPAGE分析の結果を示す。光照射後のODNを10%ピペリジン(v/v) 50 μL中で90°Cで20分間加熱処理した。図7中のXはTAMRA-<sup>eda</sup>Gを示す。図7のレーン1はマキシサム-ギルバート法によるG+A配列の場合を示し、レーン2は全長のODN1を示し、レーン3は光照射直後のものを示し、レーン4は光照射30分のものを示し、レーン5は光照射60分のものを示す。

これは、光の照射により、2本鎖のU<sup>\*</sup>の部分に発生したホールが、2本鎖を通して<sup>eda</sup>Gのサイトまで伝達されていることを示すものである。これらのことから、初期の段階



における試料のろ液の蛍光は、ロングレンジのホールの移動により、<sup>eda</sup>Gの分解により誘発されたものと考えられる。

- [0018] 光を照射した試料の蛍光は、目視によっても確認できる。この結果を図8に図面に変換した写真で示す。図8の左側はODN1/ODN2(T)からの試料によるものであり、右側はODN1/ODN2(U\*)からの試料によるものである。図8の右側のODN1/ODN2(U\*)からのものには強い蛍光が観察されたが、図8の左側のODN1/ODN2(T)からの試料にはほとんど蛍光を観察することはできなかった。

このように、2本鎖DNAの中にTAMRA-<sup>eda</sup>Gのような分解してレポーターユニットとなる蛍光発光分子を有するグアニン誘導体を導入しておくことにより、PAGE分析を行うことなくDNA中のホールの移動を検出することができることになる。

- [0019] 以上のように、本発明の8位がヘテロ原子で結合された分子を有するグアニン誘導体は、酸化、即ち電子の供与により結合された分子種を放出することが判明した。本発明はこのようなグアニン誘導体、及びそれを含有するオリゴヌクレオチドを提供するものである。本発明のグアニン誘導体における分子種の放出は比較的温和な酸化により誘発されるものであり、このような分子種の放出は蛍光タグの放出による遺伝子の解析だけでなく、生体内における特定の部位で薬物を放出させるベクターとしても極めて有用なものである。

- [0020] 本発明の8位がヘテロ原子で結合された分子を有するグアニン誘導体は、放出分子種-ヘテロ原子又は原子団-プリン環の構造を有するものであり、好ましくは前記一般式(I)で表されるものである。

一般式(I)中の-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Yの部分の部分がプリン環と放出分子種を結合させるリンカー部分に相当し、ヘテロ原子の存在によりグアニンの分解が生起し、結合していた分子種が放出される。したがって、当該リンカー部分は、グアニンの分解が可能なヘテロ原子を含有し放出分子種を固定させることができるものであれば特に制限はないが、好ましいリンカー部分としては、前記した一般式(I)で表されるものが挙げられる。ここで、X及びYはそれぞれ独立して同一又は異なるヘテロ原子であり、例えば、-O-、-NH-、-N(アルキル)-、-S-などが挙げられる。-N(アルキル)-におけるアルキル基としては、炭素数1-10、好ましくは1-5の直鎖又は分枝状のアルキル基、

例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基などのアルキル基が挙げられる。また、*n*は1から10、好ましくは1〜5の整数を示すが、 $-(CH_2)_n-$ は必ずしも直鎖のアルキレン基でなくてもよく、分枝状のアルキレン基であってもよい。また、当該アルキレン基のなかの1個又は2個以上のメチレン基が酸素原子、窒素原子などのヘテロ原子で置換されたアルキレン基であってもよい。

一般式(I)における $-X-(CH_2)_n-Y-$ の部分の例としては、前記してきた $-NH-(CH_2)_2-NH-$ 基などが挙げられる。

[0021] 一般式(I)におけるR基は、酸化により放出される分子種の部分を示し、放出されて当該分子種が有する機能を発現することができるものであればよい。このような機能を発現することができる分子種を本明細書では「機能性ユニット」と称する。このような「機能性ユニット」としては、蛍光発色するユニットやアビジンのような結合性の分子や、抗原や抗体などのレポーターとして機能するレポーターユニット、医薬品や抗体などの生体内で生体機能を調節する生体機能分子などが挙げられる。例えば、当該「機能性ユニット」として医薬品を用いた場合には、使用するオリゴヌクレオチドが特定の遺伝子とハイブリダイズすることから、特定のmRNAなどが発現している細胞に当該オリゴヌクレオチドが局在することになり、酸化剤や光の照射により当該部位において当該医薬品が選択的に放出されることになり、部位選択的なDDS製剤とすることも可能となる。

[0022] 一般式(I)における $R^1$ 、 $R^2$ は、ヌクレオシドの糖部分における連結用の基であることを示し、ヌクレオシドの場合には $R^1$ 、 $R^2$ は、それぞれ水素原子であるが、ヌクレオチドを形成するためのリン酸結合基であってもよいし、そのための中間体として使用される保護基やホスホロアミダイド基などであってもよい。

また、本発明の一般式(I)で表される化合物は、オリゴヌクレオチドであってもよく、当該オリゴヌクレオチドは、前記したような放出される分子種を有する修飾されたグアニン誘導体を含むオリゴヌクレオチドであるということが出来る。本発明のこのようなオリゴヌクレオチドは、放出される分子種を有する修飾されたグアニン誘導体を少なくとも1個有するものであり、必要に応じて2個以上有しているものであってもよい。このような場合には前記一般式(I)における $R^1$ 、 $R^2$ は、各種のヌクレオチドを示すことに

なる。このようなヌクレオチドは、1個又は2個以上の塩基を有するものであってよい。

本発明のこのようなオリゴヌクレオチドは、非常に長いものであってもよく、特に長さに制限はないが、好ましくは10〜100塩基、10〜50塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。

[0023] 本発明のオリゴヌクレオチドには、格別の電子供与基は必要ではないが、少なくとも1個の塩基が、電子供与基として機能する塩基であるオリゴヌクレオチドが好ましい。また、前記してきたように本発明の修飾グアニンはロングレンジのホールの移動によっても分解することができるので、相補鎖中の少なくとも1個の塩基が、電子供与基を含むオリゴヌクレオチドなる2本鎖のオリゴヌクレオチドも本発明の好ましいオリゴヌクレオチドとして挙げることができる。

また、本発明は、前記した本発明のオリゴヌクレオチドを酸化して、一般式(I)で表されるヌクレオチド部分におけるR基部分を放出させる方法を提供する。

本発明のR基部分の放出の概要を図9に示す。図9では、X部分に機能性ユニットが結合されており、1電子の放出によりホールが発生し、これがロングレンジで移動してX部分に伝達され、X部分の機能性ユニットがオリゴヌクレオチドから放出される様子を模式的に示したものである。

また、図10は、本発明の方法におけるオリゴヌクレオチドからの機能性ユニットとして染料分子が放出される様子を模式的に示したものである。

本発明のこの方法における酸化としては、比較的温和な酸化であればよく、例えば、1電子の供与による方法や、光の照射による酸化、イリジウム(IV)やOs(III)による酸化などが挙げられる。

## 発明の効果

[0024] 本発明のヌクレオチドでは、オリゴヌクレオチドに組み込んだ後、アミドやエステル結合生成による機能性ユニットの導入、光照射を含む穏和な酸化反応によるオリゴヌクレオチドの分解・機能性ユニットの放出が容易である。従って、核酸合成条件にとらわれずに様々な機能性ユニットを導入することができ、加えて、望む段階で機能性ユニットをオリゴヌクレオチドから切りはずすことができる。蛍光in situハイブリダイゼーション法などの蛍光測定を行った後の蛍光部位の除去、標的配列でのドラッグの放

出、使用済み標識オリゴヌクレオチドの分解などが期待される。機能性ユニットを放出させる酸化手法として、リボフラビンなどの色素を用いて光酸化、Ir(IV)やOs(III)などの金属酸化剤による酸化反応、西洋わさびペルオキシダーゼなどの酵素酸化反応が可能である。

### 図面の簡単な説明

[0025] [図1]図1は、本発明の1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)の光の照射による分解生成物のHPLCの結果を示すものである。図1の(a)は原料の1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)のHPLCであり、図1の(b)は、光の照射による分解生成物のHPLCの結果を示す。図1の(c)はイリジウムによる酸化の分解生成物のHPLCの結果を示すものである。

[図2]図2は、本発明の1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)の光の照射による分解生成物のMALDI-TOFの結果を示す。図2中の2370.61のピークは、内部標準として用いた原料のオリゴヌクレオチドのピークである。1967.68のピークは5'側の分解生成物(8)を示し、1870.11のピークは3'側の分解生成物(9)を示す。

[図3]図3は、本発明の1本鎖のオリゴヌクレオチド(ODN)に光を照射したときのLC-ESI/MS/MSによる分析結果を示すものである。図3の上段は、MS207を含むの溶出物のものであり、中段はMS207のフラグメンテーションを示したものであり、下段は、インタックC-18カラム(2.0×50mm)を用いた液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示したものである。

[図4]図4は、本発明のTAMRA-<sup>eda</sup>Gを含有するオリゴヌクレオチドの概要、及びその相補鎖の概要を示すものである。

[図5]図5は、本発明の2本鎖のDNAである、ODN1/ODN2(T)及びODN1/ODN2(U\*)にそれぞれ312nmの光を照射した結果の蛍光強度(図5の(A))及び当該オリゴヌクレオチドの分解率(図5の(B))を示す。図5の(A)は黒丸印(●)はODN1/ODN2(U\*)の場合を示し、黒四角印(■)はODN1/ODN2(T)の場合を示す。図5の(A)の縦軸は蛍光強度(a. u.)を示し、横軸は光照射からの時間(分)を示す。図5の(B)の縦軸は分解率(%)を示し、横軸は光照射からの時間(分)を示す。

。

[図6]図6は、本発明の2本鎖のDNAであるODN1/ODN2(U\*)に312nmの光を照射した結果の蛍光強度の変化を示したものである。図6の縦軸は蛍光強度(a. u.)を示し、横軸は波長(nm)を示す。

[図7]図7は、本発明の2本鎖のDNAであるODN1/ODN2(U\*)に312nmの光を照射したときの分解生成物のPAGE分析の結果を示す。図7中のXはTAMRA<sup>eda</sup>Gを示す。図7のレーン1はマキシムーギルバート法によるG+A配列の場合を示し、レーン2は全長のODN1を示し、レーン3は光照射直後のものを示し、レーン4は光照射30分のものを示し、レーン5は光照射60分のものを示す。

[図8]図8は、本発明の2本鎖のDNAである、ODN1/ODN2(T) (図8の左側) 及びODN1/ODN2(U\*) (図8の右側) にそれぞれ312nmの光を照射した結果の蛍光を目視した場合の結果を示す図面になる写真である。

[図9]図9は、本発明の方法におけるオリゴヌクレオチドからの機能性ユニットの放出を模式的に示したものである。

[図10]図10は、本発明の方法におけるオリゴヌクレオチドからの機能性ユニットとして染料分子が放出される様子を模式的に示したものである。

[0026] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### [0027] 化合物2の製造

エチレンジアミン(100mL)中に溶解した8-ブロモ-5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシグアノシン(化合物(1))溶液(2. 0g, 30. 8mmol)を130℃で7時間、還流攪拌した。濃縮乾燥後、粗生成物(2)を茶色の油状物として得た。

#### 実施例 2

##### [0028] 化合物3の製造

実施例1で得られた化合物(2)をトリフルオロ酢酸エチル10mLおよびトリエチルアミン25mL存在下、メタノール50mL中で、0℃で2時間攪拌した。濃縮乾燥後、次の段階へ進んだ。

#### 実施例 3

[0029] 8-[2-(N-トリフルオロアセチルアミノ)エチル]アミノ-2-(N, N-ジメチルアミノメチリデニル)アミノ-5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシグアノシン(化合物(4))の製造

実施例2で濃縮して得られた残渣にN, N-ジメチルホルムアミド(25mL)及びN, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール(25mL)を添加し、反応液を室温で2時間攪拌した。濃縮した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=30:1)で精製し、化合物4(1.5g、63%)を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :

9.77 (brs, 1H), 9.56 (brs, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.34-7.19 (m, 8H),  
6.83-6.80 (m, 5H), 6.48 (dt, 1H,  $J=8.0, 4.0\text{Hz}$ ), 5.83 (brs, 1H),  
4.75 (d, 1H,  $J=5.8\text{Hz}$ ), 4.07 (d, 1H,  $J=2.4\text{Hz}$ ), 3.765 (s, 3H), 3.763 (s, 3H),  
3.76-3.72 (m, 2H), 3.38 (d, 1H,  $J=8.4\text{Hz}$ ), 3.10 (s, 3H), 3.02 (s, 3H),  
3.01-2.95 (m, 2H), 2.80-2.60 (m, 3H), 2.33 (dd, 1H,  $J=13.3, 8.0\text{Hz}$ );

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :

158.92, 158.91, 158.60, 157.56, 157.19, 156.55, 151.00, 143.55, 139.43,  
134.61, 134.57, 130.29, 129.10, 128.42, 128.04, 127.82, 127.73, 127.55,  
127.05, 120.27, 117.41, 114.55, 113.30, 113.27, 113.14, 87.01, 85.74,  
82.80, 77.21, 71.87, 62.87, 55.27, 55.23, 42.65, 41.30, 40.77, 38.73,  
35.11;

MS (FAB,  $\text{NBA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $m/z$  (%) 779 [ $(\text{M}+\text{H})^+$ ];

HRMS (FAB)  $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_7\text{F}_3$  [ $(\text{M}+\text{H})^+$ ]として、

計算値 779.3129,

実測値 779.3128.

#### 実施例 4

[0030] 3'-(O-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)-8-[2-(N-トリフルオロアセチルアミノ)エチル]アミノ-2-(N, N-ジメチルアミノメチリデニル)アミノ-5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシグアノシン(化合物5)の製造

実施例3で得られた化合物(4)の溶液(70mg, 89.9  $\mu\text{mol}$ )に、2-シアノエチル

テトライソプロピルジホスホロアミダイト(31  $\mu$  L, 98.9  $\mu$  mol)及びテトラゾール(7mg, 98.9  $\mu$  mol)のアセトニトリル(900  $\mu$  L)溶液を加え、室温で2時間攪拌した。析出した塩(化合物(5))を濾別した後、濾液をそのまま次の段階へ用いた。

## 実施例 5

### [0031] オリゴデオキシリボヌクレオチド(ODN)の合成及びその特性

アプライドバイオシステムズ社392DNA/RNA合成機を用いて従来のホスホロアミダイト法によりオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成した。オリゴデオキシリボヌクレオチドを逆相高速液体クロマトグラフィー[5-ODS-Hカラム(10 $\times$ 150mm)を用い、溶出は0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート(TEAA)(pH7.0)を含むアセトニトリルの直線勾配(5%~20%/30分超)、流量3.0mL/minで行った。]に付した。精製したODN溶液の画分に50U/mLの子ウシ小腸(calf intestine)アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、0.15U/mLのヘビ毒ホスホジエステラーゼ(SVPD)及び50U/mLのP1ヌクレアーゼを加え37°Cで3時間、完全に消化されるまで反応させた。酵素分解物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[Cosmosil 5C-18AR又はCHEMCOBOND 5-ODS-H カラム(4.6 $\times$ 150mm)を用い、溶出は0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート(TEAA)、(pH7.0)を含むアセトニトリルの直線勾配(0%~20%/20分超)、流速1.0mL/minで行った。]により分析した。各ODNの濃度を、dA、dC、dG及びdT濃度0.1mMとした標準溶液のピークとの比較によって、測定した。各ODNの特性をMALDI-TOF MSにより解析した。

5'-d(TATAAT<sup>eda</sup>GTAATAT)-3':

m/z [M-H]<sup>-</sup>として 計算値 4028.72

実測値 4027.33 ;

5'-d(ATTATAGTGTGGGTTGTT<sup>eda</sup>GTTTATTAT)-3' :

m/z [M-H]<sup>-</sup>として 計算値 8732.69

実測値 8732.87

## 実施例 6

[0032] 実施例5で得られたオリゴヌクレオチド(6)60nMを、目的の機能分子のスクシンイミジルエステル体1mg(例えば安息香酸スクシンイミジルエステルなど)をジメチルスル

ホキシンド1mLに溶かした溶液50  $\mu$  Lを加えた50mMリン酸緩衝液(pH7. 0)500  $\mu$  L中で、5度16時間インキュベーションすることにより、機能化されたオリゴヌクレオチド(7)が得られた。

### 実施例 7

[0033] 1本鎖のオリゴヌクレオチドの光酸化反応

1本鎖のこのオリゴヌクレオチド(ODN)、

5'-d(TATAAT<sup>eda</sup>GTAATAT)-3' :

に、リボフラビンの存在下に366nmの光を照射した。その結果、このオリゴヌクレオチド(ODN)は速やかに分解した( $t_{1/2}$ =6. 2分)。

この結果のHPLCを図1に示す。この分解生成物を質量分析機で分析した結果を図2及び図3に示す。

分解生成物(8) (MALDI-TOF)

5'-TATAAT-OPO<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH=CH-CHO:

[M-H]<sup>-</sup> として 計算値 1968. 32

実測値 1967. 68 ;

分解生成物(9) (MALDI-TOF)

<sup>-</sup>O-PO<sub>3</sub>-TAATAT-3' :

[M-H]<sup>-</sup> として 計算値 1870. 22

実測値 1870. 11 ;

分解生成物(10) (LC-ESI/MS/MS)

[C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>4</sub>]<sup>+</sup> として M<sup>+</sup> 207

フラグメント 148, 105, 77, 59

### 実施例 8

[0034] ベンゾイル<sup>eda</sup>Gの酸化電位( $E_{1/2}$ )の測定

ベンゾイル<sup>eda</sup>G (250  $\mu$  M) の酸化電位( $E_{1/2}$ )を、ALS電気化学分析機モデル660-Aを用いて100mMのLiClO<sub>4</sub> 溶液中で室温で測定した。スキャン速度は100mV/秒であり、試料用電極としてガラス炭素電極を、カウンター電極として白金ワイヤーを、そして対照電極としてSCEを用いた。その結果、ベンゾイル<sup>eda</sup>Gの酸化電位(



$E_{1/2}$ )は0.59V (VS NHE)であった。

#### 実施例 9

[0035] ODN1/ODN2(T)及びODN1/ODN2(U<sup>\*</sup>)のそれぞれに312nmの光を照射したときの分解例

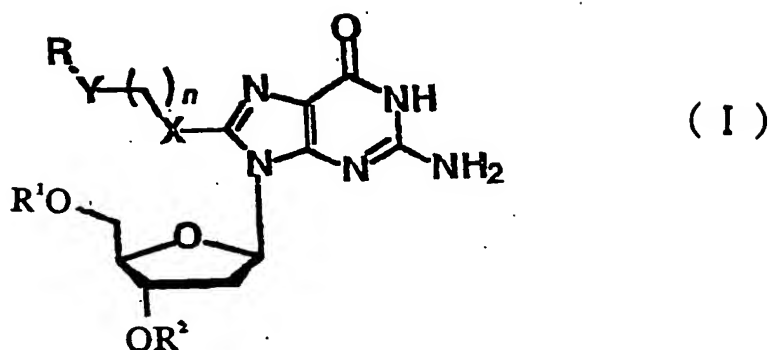
塩基濃度1mM に相当するオリゴヌクレオチドおよび電子酸化剤リボフラビン50  $\mu$  Mを含む50mMカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に対し366nmの光をトランスイルミネーターによって照射した。1分の照射で約90%、5分の照射でほぼ全量の分解が認められた。酵素分解によりヌクレオシド単位まで分解し解析を行ったところ、当該修飾ヌクレオシドでのみ分解消失していることが明らかになった。

結果を図5〜8に示す。

## 請求の範囲

[1] 次式(I)

[化1]



(式中、X及びYはそれぞれ独立して-O-、-NH-、-N(アルキル)-、-S-を示し、Rは機能性ユニット、レポーターユニット、または生体機能分子を示し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、リン酸結合基、ホスホロアミダイド基、ヌクレオチドを示し、nは1から10の数字を示す。)

で表される、ヌクレオシド、又はヌクレオチドもしくはそれを含むオリゴヌクレオチド。

[2] nが2で、X及びYが-NH-である請求項1に記載のヌクレオシド、又はヌクレオチドもしくはそれを含むオリゴヌクレオチド。

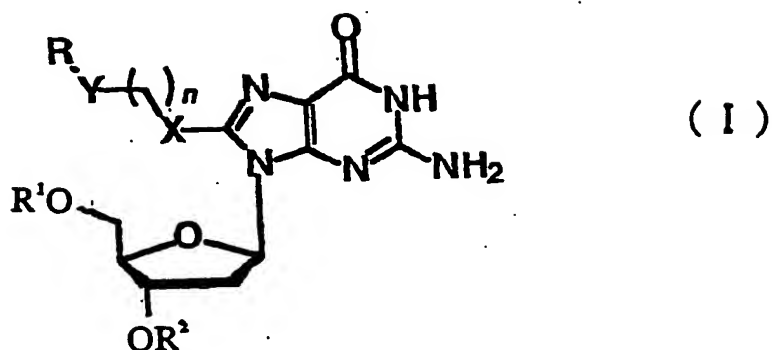
[3] Rが、蛍光発光残基である請求項1又は2に記載のヌクレオシド、又はヌクレオチドもしくはそれを含むオリゴヌクレオチド。

[4] オリゴヌクレオチドが、10〜100塩基からなるオリゴヌクレオチドである請求項1〜3のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド。

[5] 相補鎖中の少なくとも1個の塩基が、電子供与基を含むオリゴヌクレオチドなる2本鎖のオリゴヌクレオチドである請求項4に記載のオリゴヌクレオチド。

[6] 請求項1〜5のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを酸化して、次式(I)

[化2]

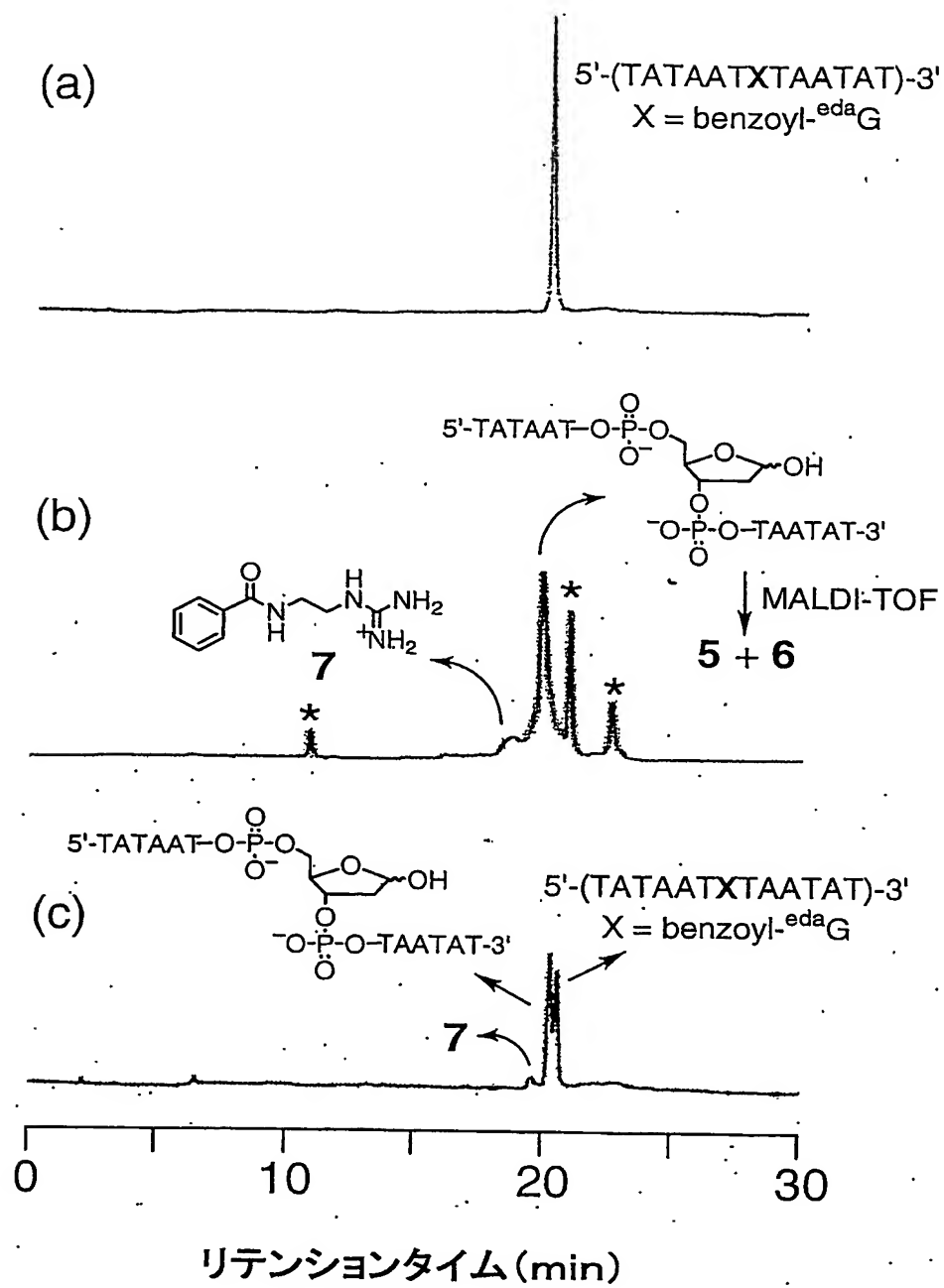


(式中、X及びYはそれぞれ独立して-O-、-NH-、-N(アルキル)-、-S-を示し、Rは機能性ユニット、レポーターユニット、または生体機能分子を示し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、リン酸結合基、ホスホロアミダイド基などを示し、nは1から10の数字を示す。)

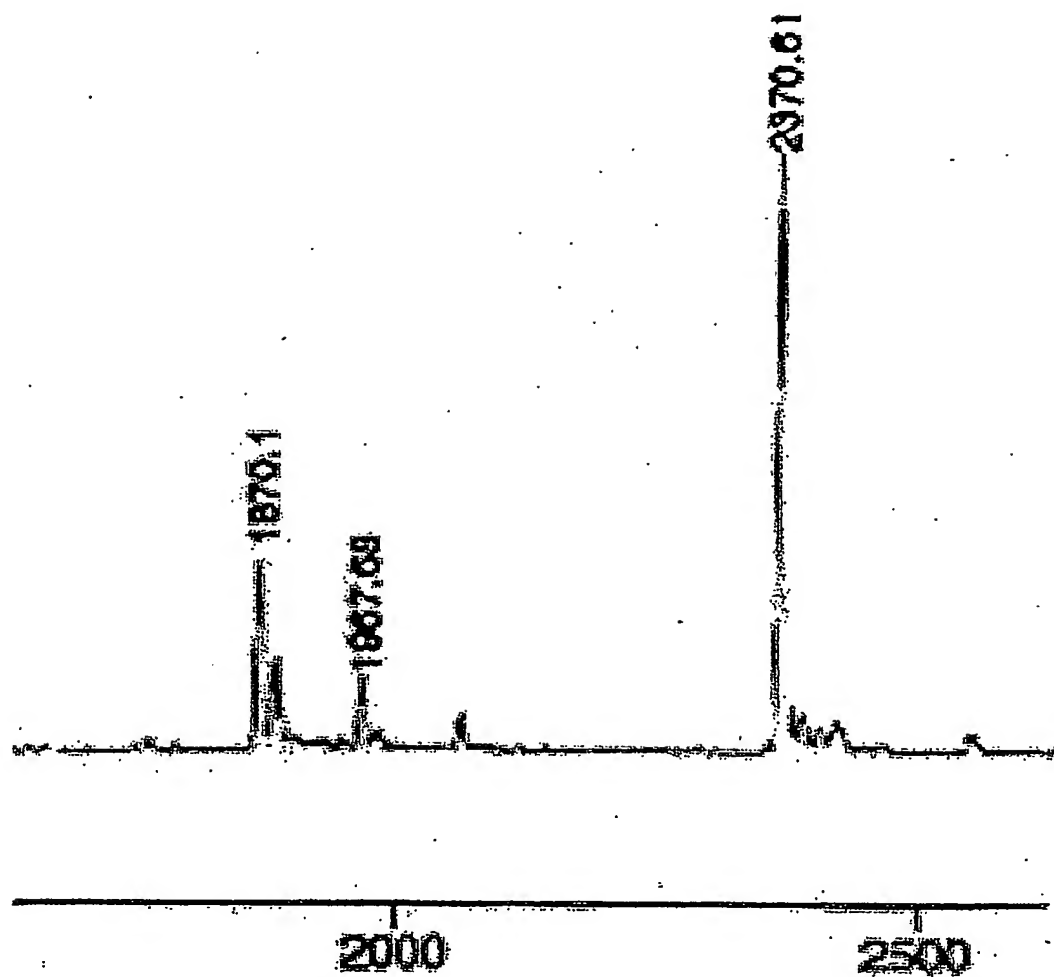
で表されるヌクレオチド部分におけるR基部分を放出させる方法。

- [7] 酸化が、1電子の供与による方法である請求項6に記載の方法。
- [8] 酸化が、光の照射によるものである請求項6又は7に記載の方法。

[図 1]

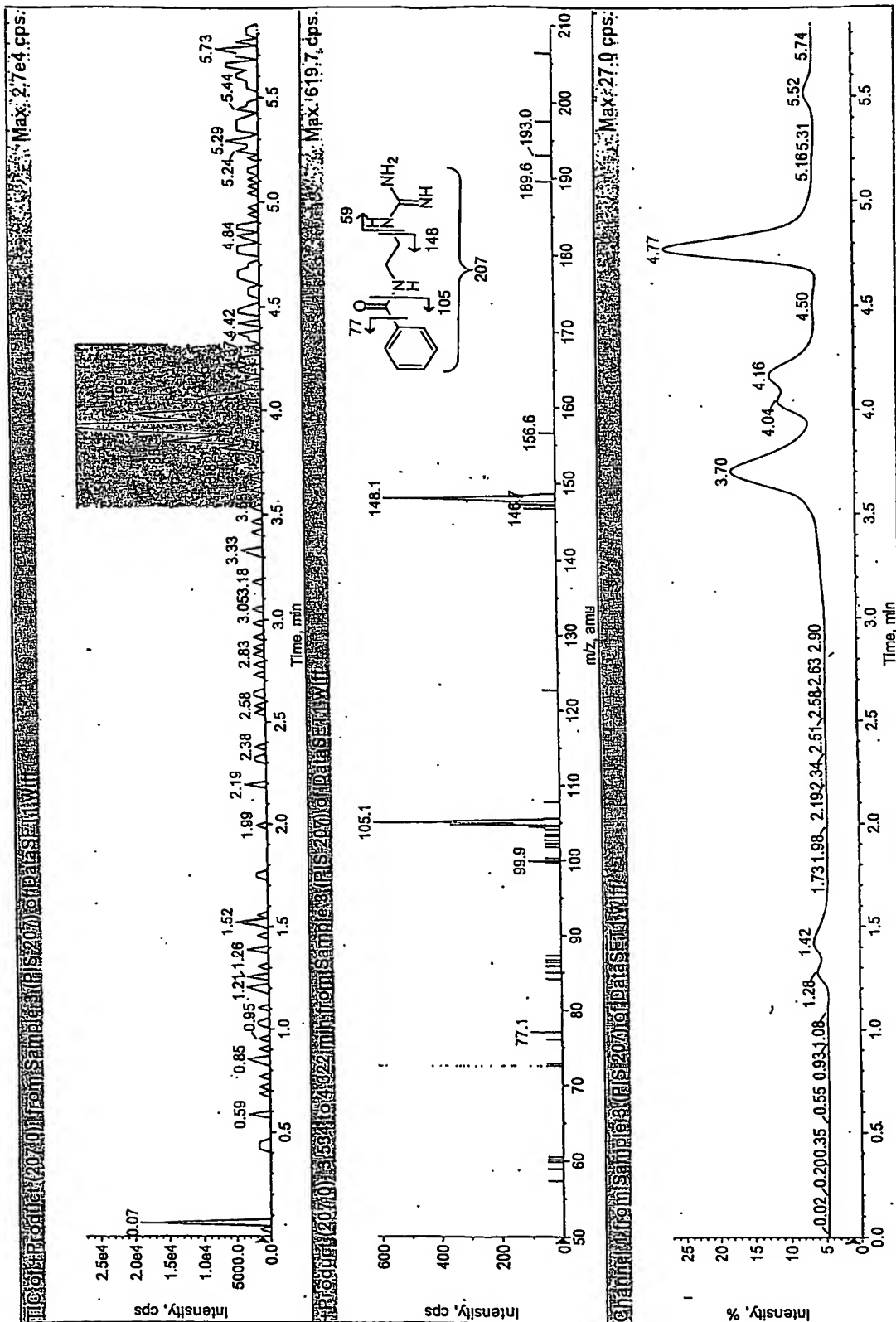


[図 2]



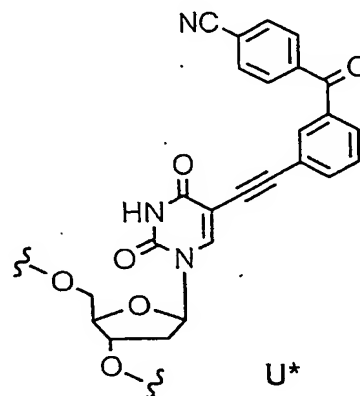
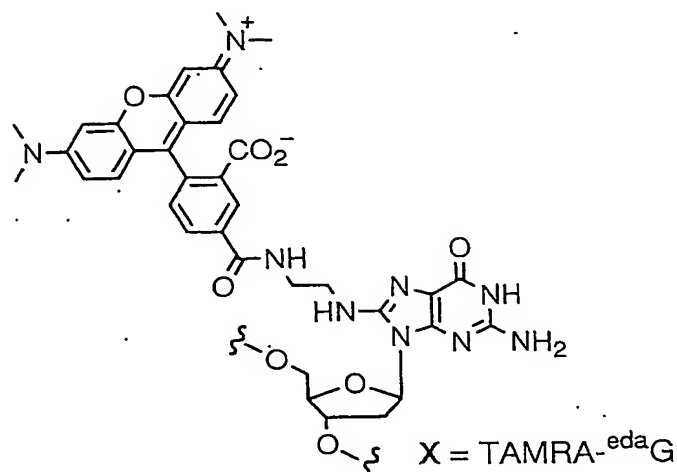
2/1/6

[ 3 ]

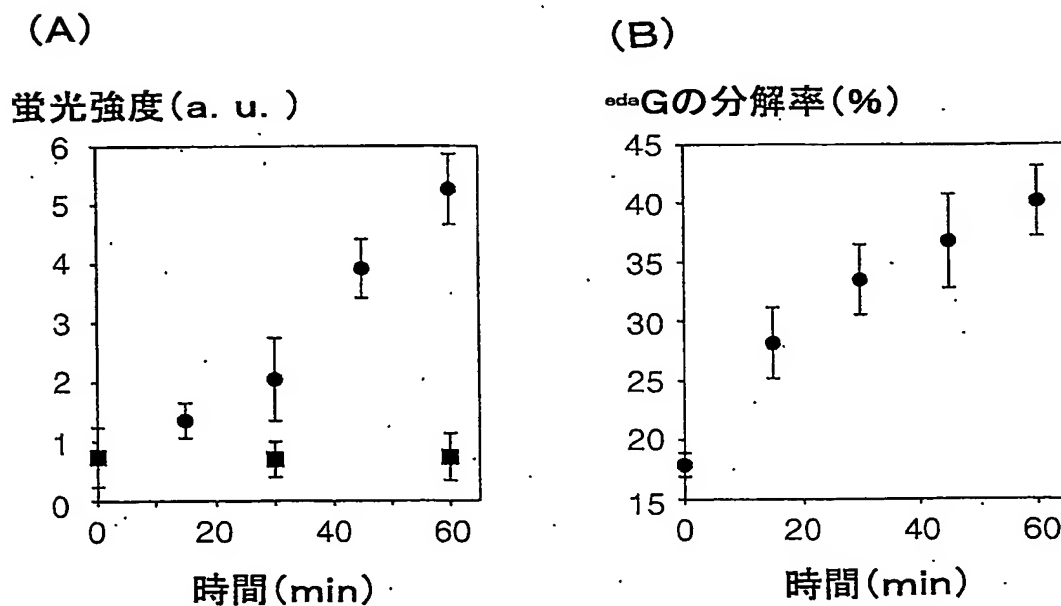


[図4]

ODN2: 5'-(<sup>32</sup>P)-d(ATTATAGTGTGGGTTGTTXTTTATTAT)-3'  
 ODN2'(U\*): 3'-d(TAAATAU\*<sup>+</sup>CACACCCAACAACAATAA)-5'  
 ODN2'(T): 3'-d(TAAATA T CACACCCAACAACAATAA)-5'

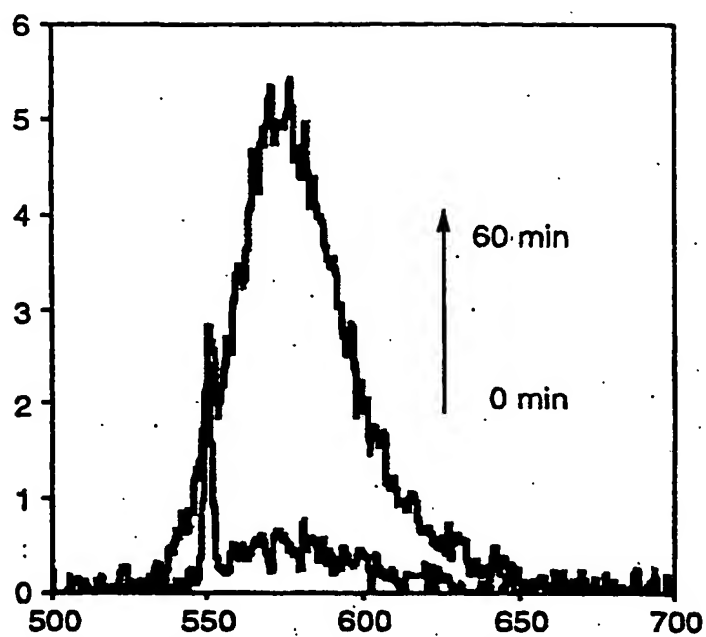


[図5]



[図6]

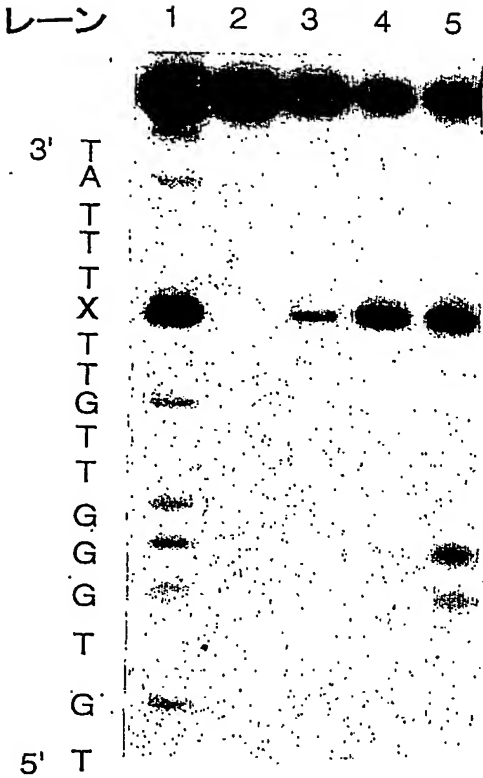
蛍光強度 (a.u.)



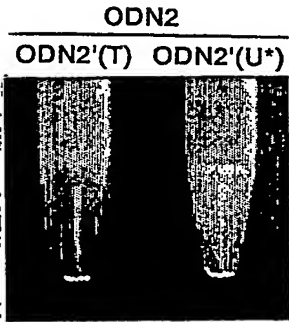
波長 (nm)



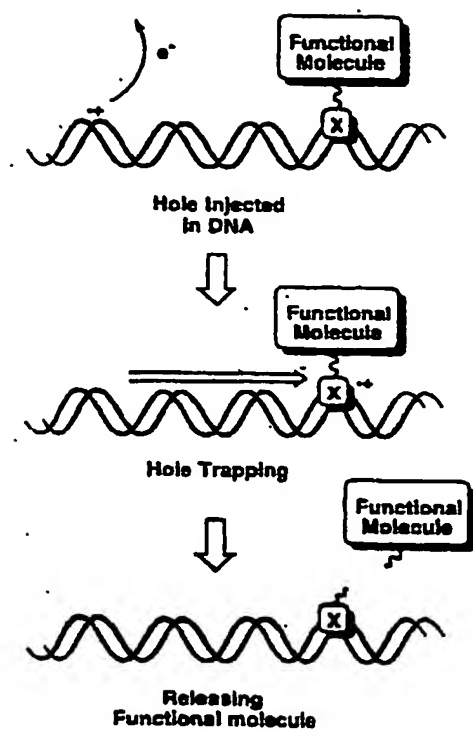
[図 7]



[図 8]



[図9]



[図10]

